稻瘟病病原物诱导启动子的构建及表达

吕华飞 明小天 瞿礼嘉 * 刘美华
李 静 顾红雅 * 陈章良 ④
(北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871;
④Demontfort University, Leicester LE 19BH, UK. * 联系人)

摘要 利用PCR技术从小麦和马铃薯中分别扩增并克隆了病原诱导性谷胱甘肽_S_转移酶基因 *GstA1* 和 *Gst1* 启动子片段, 将它们分别与水稻肌动蛋白基因(*Act1*)核心启动子序列、5′端非翻译前导序列以及 *GUS* 基因融合构建出植物载体 pWMIG_50 和 pPMIG_50, 然后转化水稻, 并对嵌合启动子的诱导活性进行了分析. 结果表明: (1) 在转基因水稻细胞中嵌合启动子可受稻瘟病病原物的诱导; (2) 水稻 *Act1* 第一内含子序列对单子叶和双子叶外源基因启动子在水稻中的表达具有重要的影响; (3) 水稻 *Act1* 基因核心启动子及其5′端非翻译前导序列可在水稻细胞中形成较低水平的组成型表达.

关键词 **病原诱导嵌合启动子 基因表达调控 转基因水稻 稻瘟病**

植物防御反应在植物抵抗病原微生物侵染的过程中起着十分重要的作用. 当植物受到病

尤其是生态学方面还有很多未知的东西, 因此对自然界采取的任何工程措施必须慎之又慎, 并且是可以调整的, 以免造成严重的后果.

(3) 对海底人工粗糙进行的大量试验研究与数值计算已经证明了它的有效性. 在日本博多港和名古屋港的建设中也曾经作为一种方案加以考虑, 但至今尚未能在工程中实现. 这说明工程师和科学家之间在考虑问题时的差别. 特别是在水利、海岸工程中, 一个创新的思路要能在工程实践中得到实现还需要一个艰苦的过程.

参 考 文 献

1 粟谷阳一, 小松利光, 川崎昌三, 等. 人工粗度を用いた恒流の生成に关する研究. 水工学论文集, 1995, 39: 589~ 594
2 Awaya Y, Komatsu T, Kawasaki S, et al. A study of generating residual current by using artificial roughness, hydra 2000. Thomas Telford, London, 1995, 3: 233~ 238
3 小桥乃子, 小松利光, 矢野真一郎, 等. V字型粗度の抵抗特性に关する基础的研究. 平成7年度土木学会西部支部研究发表会, 1996. 260~ 261
4 Komatsu T, Kohashi N, Yano S, et al. On the most suitable shape of 3_dimensional bottom roughness with directional resistance properties. Proc of 11th Congress of The IAHR_APD, Jakarta, 1998. 569~ 578
5 小松利光, 鞠承淇, 小桥乃子, 等. 流れを偏向させる动きをもつ偏流型粗度を用いた潮汐残差流の创造. 水工学论文集, 1998, 42: 577~ 582
6 小桥乃子, 小松利光, 矢野真一郎, 等. 人工底面粗度の海水交换促进效果について. 日本流体力学会年会'97讲演论文集, 1997. 511~ 512
7 吉村文宏, 鞠承淇, 小桥乃子, 等. 海底人工粗度を用いた海水交换促进に关する基础的研究. 平成9年度土木学会西部支部研究发表会, 1998. 372~ 373

(1999-04-01 收稿, 1999-07-13 收修改稿)

原微生物侵染时, 植物防卫反应即启动, 而植物细胞的有关保护蛋白基因亦被激活, 消除有害代谢产物对植物细胞的伤害[1].

谷胱甘肽_S_转移酶(GST) 是植物细胞中的一类自我保护蛋白, 它能够使细胞膜脂分子去氧化以及细胞活性氧代谢产物失去毒性, 是植物细胞中一种重要的解毒酶[1,2]. 研究表明, 小麦的谷胱甘肽_S_转移酶基因(*GstA1*) 可受大麦白粉病菌等多种病原的诱导而表达[3,4], 而马铃薯的谷胱甘肽_S_转移酶基因 (*Gst1*, 又称为 *Prp1*) 则可受马铃薯晚疫病等多种病原侵染而诱导表达[5,6]. 水稻作为一种重要的粮食作物, 其由于稻瘟病造成的减产可高达 30%[7], 因此获得稻瘟病病原物诱导启动子, 最终通过这种病原诱导启动子驱动自杀基因实现可诱导的过敏反应, 对于提高水稻抗病性和产量具有十分重要的意义[8,9]. 本研究通过 PCR 技术从小麦和马铃薯中扩增克隆了 *GstA1* 和 *Gst1* 基因的启动子元件片段, 将它们与水稻肌动蛋白基因(*Act1*) 启动子核心序列及其 5′ 端非翻译前导序列融合, 希望构建出能受稻瘟病病原诱导表达的嵌合启动子, 为水稻抗稻瘟病的基因工程应用打下基础.

1 材料与方法

( ) 材料. 大肠杆菌菌株 DH5α 和克隆载体 pBluescript ㊣SK$^+$ 均由北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室提供; pDMC201.1, pDMC205 和 pCAMBIA1300 质粒由澳大利亚 CAMBIA 的 Jefferson 博士惠赠. 小麦品种中国春(*Triticum aestivum* cv "Chinese Spring"), 马铃薯品种 Desiree (*Solanum tuberosum* cv "Desiree"), 水稻品种中花 8 号 (*Oryzae sativa* cv "Zhonghua 8") 由中国农业科学院提供. 供试病原菌为稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*), 由北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室徐庆博士提供. DNA 限制性内切酶、工具酶及随机引物标记试剂盒购自 PROMEGA 公司, PCR 试剂盒购自华美生物工程公司, T_7 DNA sequencing kit 购自 Pharmacia 公司, 放射性同位素 α_^{32}P_dCTP 为杜邦公司产品.

( ) DNA 制备和操作. 质粒 DNA 制备和操作按 Sambrook 实验手册的方法[10]. 植物 DNA 的提取采用 CTAB 方法[11]

( ) PCR 扩增及克隆. 根据报道的小麦 *GstA1*[3] 和马铃薯 *Gst1*[5] 基因启动子序列设计了两对引物, 其核苷酸序列分别为: 5′ CAGTTCTGATATTGAGACCT3′, 5′ ATAACAAGGCTACATCGACT3′ (*GstA1*) 和 5′ GACTTGATCCAAAATCTAACA3′, 5′ TGACTTATGTGCTCATGTC3′ (*Gst1*). 通过 PCR(条件同文献[12]) 扩增出小麦 *GstA1* 基因启动子片段(−115~−512) 和马铃薯 *Gst1* 基因启动子片段(−130~−407), 并分别克隆到 pBluescript ㊣SK$^+$ 的 *Eco*R Ⅰ位点, 序列分析后分别命名为 pWGST_1 和 pPGST_1. 同时根据水稻 *Act1* 基因序列设计了 5′ 和 3′ 端引物[13], 分别为 5′ GAATTCCATCGCCACTATACA3′ 和 5′ GTCTAGAGCCATCTTCTACCTAC3′, 从 pAct1_D 质粒中扩增并克隆了水稻 *Act1* 核心启动子(minimal promoter) (−1~−51) 及其 5′ 端非翻译前导序列, 包括第一外显子(+1~+81), 第一内含子(+82~+526) 和第二外显子部分序列 (+527~+540), 序列鉴定后命名为 pACT_1.

( ) 植物表达载体的构建. (1) pWMIG_50 和 pPMIG_50 的构建 用 *EcoR* Ⅳ 和 *Xba* Ⅳ酶分别酶切 pACT_1, 分离出水稻 *Act1* 核心启动子及其 5′ 端非翻译前导序列片段, 插入经同样酶切的 pWGST_1 和 pPGST, 得到含嵌合启动子的质粒 pWMI_1 和 pPMI_1. 由小麦 *GstA1* 和马铃薯 *Gst1* 基因启动子片段与水稻 *Act1* 核心启动子及其 5′ 端非翻译前导序列片段构建的融合启动

子分别简称为嵌合启动子 WGA 和 PGA . 以 *Hin*d Ⅲ和 *Xba* Ⅳ分别酶切 pWMI_1 和 pPMI_1, Klenow 酶补平后, 将 WGA 和 PGA 片段插入 pBluescript Ⅱ SK$^+$ 的 *Eco*R Ⅰ位点, 得到 pWMI_2 和 pPMI_2; 然后用 *Xba* Ⅳ酶切, Klenow 酶补平后, 再用 *Hin*d Ⅲ酶切 pGMI_2, 将 WGA 片段插入经 *Apa* Ⅳ 酶切, Klenow 酶补平及 *Hin*d Ⅲ酶切的 pDMC201. 1; 将 pPMI_2 质粒经 *Hin*d Ⅲ和 *Pst* Ⅳ酶切所得到的片段 PGA 插入经同样酶切的 pDMC201. 1; 通过序列分析确定 WGA 和 PGA 与 *GUS* 基因连接区读码框架正确; 最后把嵌合启动子 WGA 和 PGA 与 *GUS* 基因的融合构件分别插入植物表达载体 pCAMBIA1300 的 *Kpn* Ⅳ 和 *Xba* Ⅳ位点, 得到 pWMIG_50 和 pPMIG_50 (图 1). (2) pWMG_50 和 pPMG_50 的构建 pWMIG_50 质粒经 *Bst*E Ⅱ酶切, Klenow 酶补平, *Sma* Ⅳ 部分酶切, 而 pPMIG_50 质粒经 *Bst*E Ⅱ和 *Sma* Ⅳ酶切, Klenow 酶补平, 分别删除水稻 *Act1* 第一内含子序列, 载体自环得到 pWMG_50 和 pPMG_50 (图 1). (3) pMIG_50 的构建 pWMI_1 质粒用 *Hin*d Ⅲ和 *Bam*H Ⅳ酶切, 嵌合启动子片段插入经同样酶切的质粒 pPDMC_205, 得到 pGP2051 质粒, 然后以 *Eco*R Ⅳ 酶切 pGP2051 质粒, 将水稻 *Act1* 核心启动子及 5′ 端非翻译前导序列与 *GUS* 基因的融合构件克隆到 pCAMBIA1300 的 *Eco*R Ⅳ位点, 得到 pMIG_50 (图 1).

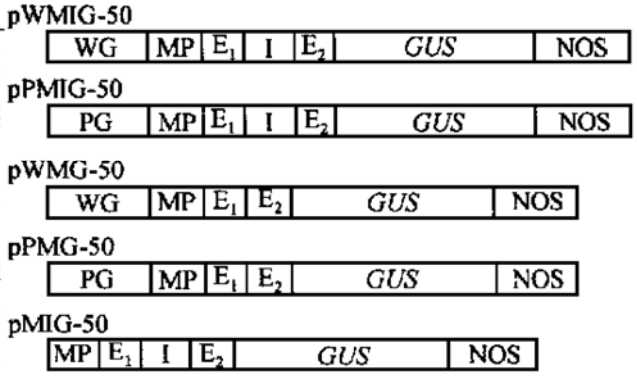


图 1 嵌合启动子构建示意图

WG ——小麦 *GstA1* 基因启动子片段; PG ——马铃薯 *Gst1* 基因启动子片段; MP ——水稻 *Act1* 核心启动子序列; E_1, I 和 E_2 —— 分别为水稻 *Act1* 非翻译前导序列中的第一非翻译外显子、第一内含子和第二外显子部分序列; NOS ——终止子序列

( ) 水稻基因转化. 水稻胚性愈伤组织的诱导使用 NB 培养基(N_6 大量元素、B_5 微量元素、B_5 有机组分、蔗糖 30 g/ L, 脯氨酸 500 mg/ L, 水解酪蛋白 300 mg/ L) 并附加 2 mg/ L 2, 4_D ; 获得的水稻愈伤组织经 2~ 3 次继代培养后用于水稻基因转化.

使用 Bio_Rad PDS_1000/ He 系统对水稻胚性愈伤组织进行基因枪转化. 水稻愈伤组织置于 NB+ 2, 4_D 2 mg/ L+ 0. 4 mol/ L 甘露醇的培养基上高渗处理 5~ 8 h 后, 用包裹金粉的质粒 DNA 轰击愈伤组织. 将一部分愈伤组织转移到诱导培养基(NB+ 2, 4_D 2 mg/ L) 培养 2~ 3 d, 通过 GUS 组织化学染色方法检测 GUS 表达活性. 将另一部分愈伤组织转至诱导培养基培养 6~ 10 d, 然后转至筛选培养基(NB+ 2, 4_D 2 mg/ L+ hygromycin 50 mg/ L) 选择培养 5~ 6 周, 抗性愈伤组织转移到筛选培养基继续培养 2~ 3 周, 在预分化培养基(NB+ ABA 5 mg/ L+ 2, 4_D 2 mg/ L+ hygromycin 50 mg/ L) 上培养 2 周并在分化培养基(NB+ 6_BA 3 mg/ L+ hygromycin 75 mg/ L) 上再生转基因植株. 转基因小植株在生根培养基(NB+ NAA 0. 1 mg/ L+ hygromycin 50 mg/ L) 上进行生根培养, 一个月后转移到土壤中栽培.

( ) 转基因水稻 Southern 杂交检测. 取 3~ 4 μg 总 DNA 用限制性内切酶完全消化, 经 1% 琼脂糖胶电泳分离后转移到尼龙膜上(Zeta_Probe GT, Bio_Rad), 用 α_^{32}P_dCTP 标记的 *GUS* 基因片段为探针进行杂交并放射自显影. 膜的杂交及洗膜的具体方法参照尼龙膜产品使用指南.

( ) 转基因水稻的病原诱导. 按照 Schweizer 等人[14] 的方法制备稻瘟病病菌诱导物. 先将稻瘟病病菌接种于马铃薯培养液, 在 25 ℃暗培养 3~ 4 d. 病菌培养液高压灭菌处理 20

min, 经纱布过滤后, 用蒸馏水按 1∶20 比例稀释. 取转基因水稻叶片, 剪成小块, 置于上述病原菌诱导物中, 于 25 ℃ 处理, 15~ 20 h 后进行 GUS 活性荧光比色测定.

( ) GUS 活性检测. 水稻 GUS 活性组织化学染色和荧光比色测定按 Jefferson 等人[15] 的方法进行. 蛋白质含量测定采用 Bradford 的方法[16].

2 结果

2.1 嵌合启动子瞬时表达活性分析

几种构件在水稻愈伤组织细胞中的瞬时表达情况是通过 GUS 组织化学染色方法来观察的, 发现在转化 pWMIG_50, pPMIG_50 和 pMIG_50 的细胞中检测到了较低的 GUS 活性, 而在转化 pWMG_50 和 pPMG_50 的细胞中未检测到 GUS 的活性. 这一结果表明, 水稻 *Act1* 基因第一内含子序列对于外源嵌合基因在水稻中的表达起着十分重要的作用, 如果 *Act1* 基因第一内含子序列缺失, 就不能启动 *GUS* 基因的表达, 这一结果与 McElrory 的结论相同[13]. 同时也表明, 带 *Act1* 基因第一内含子序列的嵌合启动子在水稻细胞中具有较低的背景表达活性.

2.2 水稻基因转化及基因组 DNA 杂交鉴定

前边实验已证明, pWMIG_50 和 pPMIG_50 在水稻愈伤组织中具有瞬时表达活性, 为了分析 pWMIG_50 和 pPMIG_50 在转基因水稻中的表达活性, 将它们分别转化到水稻中, 获得转基因水稻植株. 提取转基因水稻植株总 DNA, 用 pWMIG 和 pPMIG_50 载体上为单一酶切位点的 *Xba* iv完全酶切消化, 以 *GUS* 基因 5′ 端 563 bp 片段为探针进行 Southern 杂交检测. 结果表明, 转基因植株基因组 DNA 具有特异的杂交信号, 且不同植株中目的基因插入位点和插入拷贝数各不相同, 分别有一到二个插入拷贝(图 2(a) 和(b)). 这说明, 目的基因已经整合到水稻基因组中.

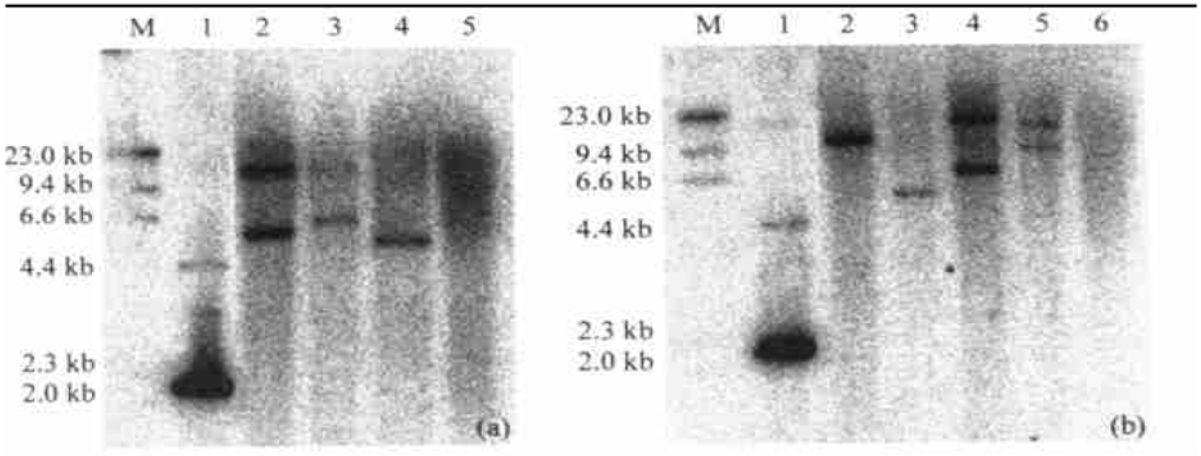


图 2 转基因水稻植株 DNA 分子杂交鉴定

(a) 转化 pWMIG_50 的转基因水稻植株. M ——λ DNA/*Hin*d ⑩分子量标准; 1 ——正对照, *GUS* 基因片段; 2~ 4 ——转基因植株总 DNA, 经 *Xba* iv 酶切; 5 ——负对照, 未转基因的水稻植株总 DNA, 经 *Xba* iv酶切; (b) 转化 pPMIG_50 的转基因水稻植株. M ——λ DNA/*Hin*d ⑩分子量标准; 1 ——正对照, *GUS* 基因片段; 2~ 5 ——转基因植株总 DNA, 经 *Xba* iv酶切; 6 ——负对照, 未转基因的水稻植株总 DNA, 经 *Xba* iv 酶切

2.3 转基因水稻 GUS 活性分析

通过 GUS 组织染色检测证实, 转化 pWMIG_50 和 pPMIG_50 的转基因水稻有较低的 GUS 背景表达活性, 而且在不同转基因植株中 GUS 活性存在一定的差异. 用稻瘟病菌诱导物处理这些转基因植物后发现, 经诱导物处理的转基因植株中 GUS 的表达活性有明显提高, 是不经诱

导物处理的对照的 1.5~ 3 倍(图 3(a)和(b)). 而嵌合启动子 WGA 和 PGA 在转基因植株中 GUS 诱导活性无明显差异(数据未列). 上述结果表明, WGA 和 PGA 在转基因水稻中都具有诱导表达功能, 可以受稻瘟病病原物诱导.

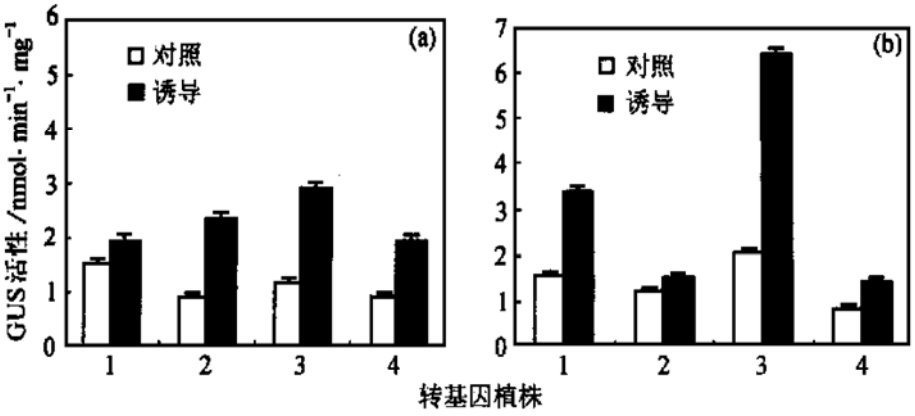


图 3 转基因水稻 GUS 诱导表达活性分析

(a) 转化 pWMIG_50 的转基因水稻; (b) 转化 pPMIG_50 的转基因水稻

3 讨论

在植物抗病基因工程研究中, 人们利用植物过敏性细胞死亡反应的这一抗病机制, 通过人工控制细胞死亡策略来获得抗病基因工程植物, 方法目前主要有两种. De Wit 提出一种双组分感受系统(two_component sensor system), 它利用植物抗病基因与病原无毒基因产物的识别来产生人工控制的细胞死亡来获得抗病植物[8]. 另一种重要的策略, 即 Strittmatter 策略, 则是将一种细胞毒性基因 barnase(编码 RNA 酶)基因置于一受病原诱导的启动子之下, 同时利用置于 CaMV 35S 启动子控制下的 barstar(编码 barnase 的抑制剂)基因来消除 barnase 基因背景表达造成的对植物细胞的伤害, 以获得转基因植物; 当病原侵染转基因植物时, 受感染部位组织中细胞毒性基因受诱导高水平表达, 超过 Barstar 基因的表达水平, 直接引起类似于植物细胞的过敏性死亡反应, 从而使植物获得抗病性[9]. 这一策略的关键在于获得合适的病原诱导性启动子. 利用这一策略人们已在马铃薯上获得了抗病转基因植物[9], 但将此方法用于水稻的抗稻瘟病基因工程研究则未见报道.

小麦 *GstA1* 基因和马铃薯 *Gst1* 基因都是病原侵染迅速诱导表达的, 小麦和马铃薯在接种病原菌 2~ 6 h 就可以检测到这 2 个基因的转录水平有明显增加[4,5], 这说明这两种植物细胞能够及时识别病原体并诱导激活其转录; 而且这 2 个基因都具有不为光照、紫外线 、化学诱导物及伤害等因素诱导的特性, 故可利用它们的启动子来控制 De Wit 双组分感受系统策略中的病原无毒基因或 Strittmatter 策略中的细胞有害基因的诱导表达.

水稻的 *Act1* 是一个组成型表达的基因, McElroy 等人[13] 发现, 其启动子是水稻细胞中的一个高效表达启动子, 而它的第一内含子序列对基因的表达有至关重要的作用. 若将 *Act1* 中的第一内含子序列缺失, 则检测不到该基因启动子下游 *GUS* 基因的表达活性. 进一步的研究发现, 水稻 *Act1* 第一内含子序列并没有类似增强子的功能, 因此可能与基因转录后前体 mRNA 的剪接调控有关[13]. 从本文的研究来看, 由于 *Act1* 基因核心启动子及其 5′ 端非翻译前导序列在水稻中有一定的组成型表达, 故杂合启动子在水稻细胞中检测到一定的低背景表达活性的.

Martini 等人[5,6]对马铃薯 *Gst1* 基因启动子的表达调控进行了详细的研究,发现 *Gst1* 启动子区有一个 273 bp 的片段在转基因马铃薯中不仅受马铃薯晚疫病菌侵染诱导,且植物病毒的侵染也能诱导其表达. 小麦 *Gst1* 基因启动子是可受多种病原诱导的,但对其病原诱导调控元件尚未进行过功能鉴定[3,4].

本研究的设计思路是利用水稻 *Act1* 基因的启动子核心元件,通过融合使小麦和马铃薯的广谱病原诱导启动子能够在水稻中表达,并保持其病原诱导活性,最终采用 Strittmatter 的抗病策略来创造抗病的基因工程水稻. 我们通过 PCR 技术从马铃薯中扩增并克隆 *Gst1* 基因启动子区的这个 273 bp 的调控元件序列,同时从小麦中扩增并克隆了与前述病原诱导调控元件处于相似区域的小麦 *GstA1* 基因启动子片段(约 396 bp),进一步对其与水稻 *Act1* 基因启动子核心元件构建的融合启动子在转基因水稻中的表达进行了分析. 实验证明,2 个分别来源于单子叶植物(小麦)和双子叶植物(马铃薯)的启动子片段与水稻 *Act1* 核心启动子元件融合构建的嵌合启动子 WGA 和 PGA 在水稻细胞中能够为水稻的真菌病原_稻瘟病病原菌所诱导. 这种受稻瘟病病原菌诱导表达的嵌合启动子的获得为通过基因工程方法获得抗稻瘟病的水稻打下了坚实的基础.

WGA 和 PGA 在水稻中有低水平的表达主要是由于水稻 *Act1* 基因核心启动子元件的低水平组成型表达造成的. 当利用上述启动子驱动 barnase 基因在水稻中表达时,可以同时使用花椰菜病毒(CaMV) 35S 启动子驱动 barstar 基因来消除其背景表达或者将病原诱导调控元件与在水稻中没有背景表达的启动子核心元件融合构建嵌合启动子,例如 CaMV 35S 启动子核心元件,它不能起始基因转录并且已用于构建病原或其他因素诱导的嵌合启动子[9]. 因此,可将病原诱导调控元件与这一核心启动子及水稻 *Act1* 基因的第一内含子融合构建嵌合启动子并用于驱动下游基因在水稻细胞中高效诱导表达,从而解决病原诱导嵌合启动子的低水平背景表达的问题.

目前由这两个嵌合启动子带动 barnase 基因和利用 CaMV 35S 启动子带动 barstar 基因的构件已经转化到水稻中,转基因植株的抗病性鉴定正在进行当中.

致谢 承澳大利亚 CAMBIA 的 R. Jefferson 博士惠赠 pDMC201.1, pDMC205 和 pCAMBIA1300 质粒,中国农业科学院李梅芳研究员提供水稻品种中花八号(*Oryzae sativa* cv Zhonghua 8)种子,谨致谢忱. 本工作为国家"八六三"高技术计划资助项目.

参 考 文 献

1 Hammond_Kosack K E, Jones J D G. Resistance gene_dependent plant defense responses. Plant Cell, 1996, 8: 1773~ 1791
2 Marrs K A. The function and regulation of glutathione_S_transferases in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1996, 47: 127~ 158
3 Dudler R, Hertig C, Rebman G, et al. A pathogen _induced wheat gene encodes a protein homologous to glutathione_S_transferases. Mol Plant Ineract, 1991, 4: 14~ 18
4 Mauch F, Dudler R. Differential induction of distinct glutathione_S_transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. Plant Physiol, 1993, 102: 1193~ 1201
5 Martini N, Egen M, Runtz I, et al. Promoter sequences of a potato pathogenesis- related gene mediate transcriptional activation selectively. Mol Gen Genet, 1993, 236: 179~ 186
6 Strittmatter G, Gheysen G, Gianinazzi_Pearson V, et al. Infections with various types of organisms stimulate transcription from a short promoter fragment of the potato gst1 gene. Mol Plant_Microbe Interact, 1996, 9: 68~ 73

快离子在 C_{60} 薄膜中电子能损效应

金运范 杨 茹 刘昌龙 王衍斌
程 松 刘 杰 侯明东 姚江东④
(中国科学院近代物理研究所; ④兰州大学物理系, 兰州 730000)

摘要 用Raman散射技术分析了171.2 MeV S^{9+} 和120 keV的 H^+ 离子在 C_{60} 薄膜中电子能损引起的效应, 即晶态→非晶态转变. 在 H^+ 离子辐照的情况下, 发现电子能损有明显的退火效应, 致使 C_{60} 晶态→非晶态转变过程中, 经过一个石墨化的中间过程. 而在 S^{9+} 离子辐照的情况下, 电子能损的破坏作用超过了退火效应, 不存在石墨化的中间过程.

关键词 **电子能损效应** **C_{60}薄膜** **快离子** **退火效应**

能量为0.1~300 MeV/amu的快重离子通过固体材料时主要通过电子的激发和电离(电子能损 S_e)损失其能量, 电子能损与核能损之比(S_e/S_n)可达 10^3 量级. 因此, 快重离子在固体材料中引起的效应本质上是电子能损效应. 能量为100 keV左右的 H^+ 离子在与固体材料相互作用过程中, 与快重离子有类似之处, 电子能损主导了其引起损伤的全过程. 快重离子在 C_{60} 中电子能损效应的研究, 或许涵盖了快重离子在完整晶体和高分子材料中电子能损效应的基本特点, 这是认识快重离子与凝聚态物质相互作用的基本规律和开发 C_{60} 应用的基础. 这方面的研究工作是最近几年才起步的[1,2], 因此, 大量的实验现象有待于系统的揭示, 相互作用的物理有待于进一步认识, 在此基础上才能有效地开发 C_{60} 的应用.

为了研究 C_{60} 中的电子能损效应, 我们用171.2 MeV S^{9+} 和120 keV的 H^+ 离子辐照了 C_{60} 薄

7 Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, et al. Signaling in plant_microbe interactions. Science, 1997, 276: 726~728
8 De Wit P J G M. Molecular characterization of gene for gene systems in plant fungus interactions and the application of avirulence gene in the control of plant pathogens. Annu Rev Phytopathol, 1992, 30: 391~418
9 Strittmatter G, Janssens J, Opsomer C, et al. Inhibition of fungal disease development in plants by engineering controlled cell death. Biotech, 1995, 13: 1085~1089
10 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T M. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
11 Clark M S 主编. 植物分子生物学实验手册. 顾红雅, 瞿礼嘉译. 北京: 高等教育出版社; 海德堡: 德国施普林格出版社, 1998
12 杨崇林, 汪 敏, 李 毅, 等. 番茄抗病基因 *Cf*-9 的3′ UTR区含有内含子序列. 植物学报, 1998, 40: 809~813
13 McElrory D, Blowers A, Jenes B, et al. Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (*Act1*) 5′ region for use in monocot transformation. Mol Gen Genet, 1991, 231: 150~160
14 Schweizer P, Buchala A, Silverman P, et al. Jasmonate_inducible genes are activated in rice by pathogen attack without a concomitant increase in endogenous jasmonic acid levels. Plant Physiol, 1997, 114: 79~88
15 Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. Gus fusions: glucronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J, 1987, 6: 3901~3907
16 Bradford M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem, 1976, 72: 208~254

(1999-02-26收稿, 1999-06-21收修改稿)